مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۳) زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۱۳۱-۱۲۲

Original Article

جداسازی و شناسایی میکروفلورای استخرهای پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی (*لیتوپنئوس وانامی*) و ارزیابی آن ها به عنوان پروبیوتیک

مینا زیارتی[۱]، مهران آوخ کیسمی[۲]، فرشید کفیل زاده*[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی، [۲]استادیار، گروه بیوتکنولوژی آبزیان، مرکز آموزش جهاد کشاورزی بوشهر،
[۳]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گروه میکروب شناسی

چکیده

سابقه و هدف: امروزه پرورش میگو در اکثر کشورهای استوایی رایج شده است. اما در حال حاضر بیماری‌های فراوانی پرورش میگوی سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده اند. عوامل عفونی باکتریایی مهم ترین معضل بهداشتی بیماری های میگوی پرورشی هستند. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی فلور باکتریایی آب پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی (*لیتوپنئوس وانامی*) در استخرهای پرورشی استان بوشهر و بررسی آنها به عنوان پروبیوتیک می باشد.

مواد و روش ها: نمونه های میگو و آب ۱۰ استخر پرورش میگوی استان بوشهر به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه های میگو کالبد شکافی گردیدند. باکتری های جداسازی شده بر اساس آزمون های بیوشیمیایی، ریخت شناسی و نرم افزار بیولوگ شناسایی شدند. سپس با استفاده از دو روش چاهک گذاری و دیسک گذاری فعالیت ضدباکتریایی آن ها در برابر ۶ باکتری بیماری زا ارزیابی گردید.

یافته ها: از آب پرورشی و دستگاه گوارش میگو ۱۲ جنس مختلف از باکتری ها جداسازی شدند. بیشترین فراوانی باکتری‌های جداسازی شده مربوط به *باسیلوس*، *ویبریو* و *سودوموناس* بود. از بین جدایه ها باکتری های *باسیلوس*، *میکروکوکوس* و *کورینه باکتریوم* بیشترین اثر آنتاگونیستی را در برابر باکتری های پاتوژن مورد بررسی از خود نشان دادند.

نتیجه گیری: تقریباً تمام باکتری های جداسازی شده از دستگاه گوارش میگو در استخرهای پرورشی نیز یافت شدند. باکتری هایی مانند *باسیلوس* با تولید مواد ضدمیکروبی مانع رشد پاتوژن ها می شوند.

واژگان کلیدی: دستگاه گوارش، *لیتوپنئوس وانامی*، باکتری های بیماری زا.

دریافت مقاله: خرداد ۱۳۹۱ پذیرش برای چاپ: مرداد ۱۳۹۱

مقدمه

در بیست سال گذشته، صنعت آبزی پروری به ویژه میگو و ماهی به طور عظیمی رشد داشته است. سازمان فائو تخمین زده است که در سال ۲۰۲۰ نیمی از تقاضای غذایی جهان با آبزی پروری پاسخ داده خواهد شد. امروزه پرورش میگو در سرتاسر کشورهای استوایی رایج شده است. در حال حاضر بیماری های زیادی پرورش میگوی سراسر جهان را تحت تاثیر قرار داده اند. میکروارگانیسم های پاتوژن زیادی در این شیوع رایج هستند (۱). در میان مهم ترین معضل بهداشتی و بیماری های میگوی پرورشی، عوامل عفونی باکتریایی به ویژه عوامل مولد ویبریوزیس در میگوهای پنائیده (Penaeidae) دیده

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گروه میکروب شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۱۱۴۰۷۹۹ پست الکترونیک: kafilzadeh@jia.ac.ir

می‌شوند (۲ و ۳). یکی از مهم ترین و جدی ترین بیماری های باکتریایی ویبریوزیس است که تلفات و خسارات قابل توجهی را در کارگاه های پرورش میگو ایجاد می نماید و از طرفی همین باکتری ها جزء میکروفلورای دستگاه گوارش میگو نیز می باشند. بنابراین شناسایی فلور باکتریایی میگو از این نظر اهمیت دارد که می توان برخی باکتری های فرصت طلب ایجاد کننده بیماری های باکتریایی را شناسایی و از آن ها به عنوان پروبیوتیک استفاده نمود (۴). برای حفاظت و کنترل بیماری های میکروبی از آنتی بیوتیک ها، آفت کش ها و سایر مواد شیمیایی استفاده می گردد که آنتی‌بیوتیک ها باکتری ها را کشته یا رشد آن ها را به وسیله مداخله در عملکردهای اساسی آن ها از قبیل سنتز دیواره، RNA و DNA متوقف می کنند. ولی آنتی بیوتیک ها سبب بروز مقاومت باکتریایی نیز می گردند. نگرانی در مورد مقاومت آنتی بیوتیکی پژوهشگران را به جستجوی راه‌های جدید کنترل بیماری ها ترغیب نموده است. هم اکنون محققین با استفاده از باکتری های پروبیوتیک در آبزی پروری برای بهبود کیفیت آب تلاش می کنند. ارگانیسم های پروبیوتیک به عنوان میکروب های زنده سبب تغییر جمعیت میکروبی محیط، بهبود کیفیت محیط اطراف میگوها، افزایش ارزش تغذیه ای میگو و افزایش پاسخ میزبان علیه میکروب ها می شوند (۱). مساله ای که وجود دارد این است که ۶۰ تا ۷۰ درصد هزینه تولید میگو مربوط به غذا است که با مصرف پروبیوتیک و افزایش ضریب هضم و جذب غذا ضریب تبدیل غذا بهبود یافته و هزینه غذای مصرفی به نصف کاهش می یابد. علاوه بر این ۱۵٪ هزینه تولید میگو مربوط به تعویض آب است که با مصرف پروبیوتیک کیفیت آب مزارع افزایش یافته و به دلیل حذف تعویض آب، هزینه تولید نیز کاهش می یابد. علاوه بر موارد یاد شده می توان گفت که باکتری های دستگاه گوارش میگو از محیط زندگی آن ها و آب تاثیر می پذیرند و به طور عجیبی وابسته به محیط خارج آن هستند. بنابراین استفاده ازپروبیوتیک‌های باکتریایی برای درمان محیط پرورشی آبزی بهتر از دیگر مکمل های غذایی مطرح می گردد (۴ و ۵). یک راه معمول برای انتخاب پروبیوتیک مناسب، شناسایی باکتری های کاندید در شرایط آزمایشگاه و به کمک آزمون های آنتاگونیسمی است که در آن پاتوژن ها در معرض تولیدات خارج سلولی کاندیداهای پروبیوتیک قرار می گیرند (۶). استان بوشهر با اختصاص بیش از ۵۶٪ از اراضی زیر کشت میگو و ۶۴٪ تولید میگوی پرورشی کشور به خود در سال ۱۳۸۳ به عنوان پیشتاز صنعت میگوی کشور بوده، اما متاسفانه در سال های اخیر بروز بیماری ها و شرایط نامطلوب ضربه سنگینی را به صنعت پرورش میگوی استان بوشهر وارد نموده است (۷). این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی باکتری های آب پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی (*Litopenaeus vannamei*) در استخرهای پرورشی استان بوشهر و بررسی آن ها به عنوان پروبیوتیک انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری و انتقال به آزمایشگاه: به منظور انجام نمونه‌برداری ۵ ایستگاه که شامل ۱۰ استخر بودند در نظر گرفته شد. برای نمونه برداری میگو از استخرهای پرورشی از تور دستی و سینی غذادهی و سالیک استفاده گردید. نمونه برداری هر ۱۰ روز یک بار و هم‌زمان با بیومتری میگوها انجام شد و هر روز عوامل دما، شوری، pH و .... بررسی و ثبت گردید. نمونه های جمع آوری شده بیمار و سالم به طور جداگانه به روش کاملاً استریل و خنک و در ورقه های آلومینیوم به آزمایشگاه منتقل شدند. برای نمونه برداری از آب پرورش میگو از لوله های درپیچ دار استریل استفاده گردید.

ب) تهیه کشت میکروبی و شناسایی: پس از ضدعفونی کردن سطح بدن میگوها و شستشو با آب مقطر، برای برداشتن قسمت های گوارشی، میگوها کالبد شکافی شدند. اندام های مشابه با آب مقطر استریل رقیق سازی گردیدند و روی پلیت های محیط کشت پخش شدند. از محیط کشت های پپتون واتر، تریپتیک سوی براث، نوترینت براث، تریتیک سوی آگار، نوترینت آگار، مک کانکی آگار، تیوسولفات سیترات بایل سالت سوکروز آگار (TCBS) و سودوموناس آگار (همگی مربوط به

شرکت مرک کشور آلمان) به منظور جداسازی اولیه و تعیین شمارش کل باکتری ها (TPC) استفاده گردید. تمامی پلیت ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. رشد باکتری با کدر نمودن محیط مایع و ظهور پرگنه بر روی محیط کشت جامد مشخص گردید. سپس ۱۰٪ نمونه های باکتریایی رشد یافته بر روی هر پلیت خالص سازی شدند.

برای نمونه های آب پرورش میگو نیز رقیق سازی انجام و سایر روش ها مطابق با روش های مشابه توصیفی برای نمونه میگو صورت گرفت (۸ و ۹). پس از کشت اولیه، جداسازی و خالص سازی نمونه ها، به منظور بررسی وضعیت ریخت شناسی، آزمون های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، اکسیداز، ایندول، گلوکز، آرابینوز و... انجام گردید (۱۰) و تا حد امکان نسبت به شناسایی و طبقه بندی باکتری ها در سطح گونه اقدام شد. به منظور صحت شناسایی بیوشیمیایی، نمونه ها با نرم افزار بیولوگ در سطح گونه شناسایی گردیدند. میکروفلورای جداسازی شده از دستگاه گوارش میگو که در TSB نگهداری شده بودند برای یافتن کاندیدای پروبیوتیک غربالگری شدند. در این آزمایش چند گونه باکتریایی به عنوان باکتری های بیماری زا مورد استفاده قرار گرفتند. دو روش آزمایش ضد باکتریایی شامل چاهک گذاری و دیسک گذاری برای تعیین پروبیوتیک مناسب انجام شد.

ج) بررسی فعالیت ضد باکتریایی نمونه ها به روش چاهک گذاری: در این روش یک کشت از باکتری های بیماری زا روی محیط جامد TSA تهیه گردید. پلیت ها در انکوباتور ۳۰ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. سپس در پلیت ها چاهک هایی ایجاد شد. مقداری از نمونه های جداسازی شده در TSB را در چاهک ها پیپت کرده و پلیت ها برای ۲۴ ساعت در انکوباتور پرورش داده شدند. قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک ها به عنوان فعالیت ضدباکتریایی مشاهده و ثبت گردید (۱۱ و ۱۲).

د) بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه ها به روش دیسک گذاری: برای این روش دیسک هایی تهیه شد. سپس دیسک ها در محتویات درون سلولی باکتری های جداسازی شده غوطه ور گردیدند و روی هر یک از عوامل باکتریایی بیماری زای کشت شده روی پلیت TSA گذاشته شدند. سپس این پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد گرما گذاری شدند و در نهایت قطر هاله عدم رشد اطراف دیسک ها اندازه گیری و ثبت گردید (۱۳).

یافته‌ها

الف) شمارش کلی باکتری ها: شمارش کلی باکتری های آب پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی روی محیط های TSA، TCBS، سودوموناس آگار و مک کانکی آگار در جدول ۱ ذکر شده است.

ب) شناسایی فلور باکتریایی: پس از تعیین ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی و بر اساس کتاب باکتری شناسی برگی، نمونه های جداسازی شده در ۱۲ گروه مختلف طبقه بندی شدند. ۱۲ جنس از آب استخرهای پرورشی و دستگاه

جدول ۱: شمارش باکتریایی بر روی محیط‌های انتخابی مختلف در طول کشت میگوی سفید غربی.

محیط های کشت عمومی و اختصاصی	تراکم باکتری های دستگاه گوارش ($cfu.g^{-1}$)	تراکم باکتری های آب پرورش میگو ($cfu.ml^{-1}$)
تریتیک سوی آگار	۱۴۰۰۰۰۰۰۰± ۴/۶	۹۶۰۰۰۰±۲/۶
مک کانکی اگار	۵۲۰۰±۱۷۲	۳/۴±۰/۹
TCBS	۷۲±۲/۸	۰/۰۳±۰/۰۱
سودوموناس آگار	۳/۸±۱/۱	۰/۰۰۳±۰/۰۰۱

جدول ۲: تنوع و فراوانی باکتری های جداسازی شده از آب پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی.

شماره	باکتری جدا شده	دستگاه گوارش تعداد (٪)	آب استخر تعداد (٪)
۱	*میکروکوکوس*	۴ (۱۱/۷)	۷ (۱۶/۷)
۲	*اسیدووراکس*	۱ (۲/۹)	۱ (۲/۴)
۳	*انتروباکتریاسه*	۳ (۸/۸)	۲ (۴/۸)
۴	*آلکالجینز*	۲ (۵/۹)	–
۵	*باسیلوس*	۶ (۱۷/۶)	۳ (۷/۱)
۶	*کورینه‌باکتریوم*	۴ (۱۱/۷)	۳ (۷/۱)
۷	*استافیلوکوکوس*	۲ (۵/۹)	۲ (۴/۸)
۸	*آئروموناس*	۱ (۲/۹)	۱ (۲/۴)
۹	*سودوموناس*	۴ (۱۱/۷)	۶ (۲/۴)
۱۰	*بروی‌باکتریوم*	۱ (۲/۹)	۲ (۴/۸)
۱۱	*ویبریو*	۶ (۱۷/۶)	۱۵ (۳۵/۷)
۱۲	شناسایی نشده	–	–
–	جمع	۳۴ (۱۰۰)	۴۲ (۱۰۰)

جدول ۳: فعالیت ضدباکتریایی نمونه های جداشده از دستگاه گوارش میگوی سفید غربی.

جدایه	*آئروموناس هیدروفیلیا*		*ویبریو پاراهمولیتیکوس*		*اشریشیا کلی*		*سودوموناس آئروجینوزا*		*سالمونلا*		*ویبریو کلرا*	
روش	۱	۲	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱	۲	۱
کورینه‌باکتریوم	+	–	+	+	+	–	+	+	–	+	+	+
میکروکوکوس	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
انتروباکتریاسه	–	–	+	+	–	–	–	–	–	+	+	+
آئروموناس	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
بروی‌باکتریوم	+	+	+	+	–	–	–	–	+	+	–	–
آلکالجینز	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+
استافیلوکوکوس	+	+	–	+	–	–	–	–	+	+	–	–
اسیدووراکس	–	–	+	+	–	–	+	–	–	–	+	+
ویبریو	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
سودوموناس	–	–	+	–	–	–	–	+	–	+	+	+
باسیلوس	+	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	–
شناسایی نشده	+	+	–	+	–	–	+	–	–	–	+	+

(۱) روش چاهک گذاری، (۲) روش دیسک گذاری، (+) دارای فعالیت ضد باکتریایی، (–) فاقد فعالیت ضد باکتریایی

گوارش میگو شناسایی گردیدند. جنس های غالب جداسازی شده شامل *ویبریو*، *باسیلوس* و *سودوموناس* بودند. بیشتر باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌ها گرم منفی بوده اما نمونه های گرم مثبت نیز شامل *باسیلوس*، *میکروکوکوس* و *استافیلوکوکوس* نیز جداسازی گردیدند. تنوع و فراوانی باکتری های جداسازی شده در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج بررسی فعالیت ضدباکتریایی نمونه های جداسازی شده در برابر عوامل باکتریایی بیماری زا به روش های چاهک گذاری و دیسک گذاری در جدول ۳ نشان داده شده است. *باسیلوس*، *میکروکوکوس* و *کورینه باکتریوم* فعالیت ضدباکتریایی بیشتری را در مقابل شش باکتری بیماری زا (*آئروموناس هیدروفیلا*، *ویبریو پاراهمولیتیکوس*، *اشریشیا کلی*، *سودوموناس*، *سالمونلا* و *ویبریو کلرا*) نشان دادند. *باسیلوس ها* هاله عدم رشد بیشتری را در مقابل باکتری‌های بیماری‌زا در هر دو روش نشان دادند. در روش چاهک گذاری قطر هاله عدم رشد ۱۵ mm بود، اما در روش دیسک گذاری قطر هاله عدم رشد ۹ mm بود.

بحث

در پژوهش حاضر چندین استخر پرورش میگو مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی استخرها بین متغیرهای فیزیکوشیمیایی مورد بررسی هیچ گونه تفاوت معنی داری مشاهده نشد. دامنه تغییرات ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آب استخرها در حدود میزان اپتیمم مورد نیاز برای پرورش میگوی سفید غربی بود. در این مطالعه میزان شمارش کلی باکتری های آب پرورشی و دستگاه گوارش میگوی سفید غربی روی محیط TSA به ترتیب $۱۰^{۵}$ $cfu.ml^{-1}$ ۹/۶ و $۱۰^{۸}$ $cfu.g^{-1}$ ۱/۴ به دست آمد. تراکم باکتریایی آب پرورش میگوی آب شیرین توسط فاتارپکار (Phatarpekar) و همکاران در سال ۲۰۰۲، $۱۰^{۴}$ $ml.cfu^{-1}$ ۴/۶ و همچنین توسط کیسمی (Keysami) و همکاران در سال ۲۰۰۵، $۱۰^{۶}$ $ml.cfu^{-1}$ ۹/۲ گزارش شده است (۱۰ و ۱۴). تفاوت در شمارش کلی باکتری های آب پرورش میگو به تفاوت در سیستم کشت و مدیریت تبادل آب وابسته است. زیرا تفاوت مهمی در تراکم باکتریایی استخرهای مشابه در تحقیق جاری مشاهده نشد. در مطالعه حاضر بیشتر باکتری های جداسازی شده گرم منفی بودند. این نتیجه قبلاً نیز در میگوی آب شیرین توسط میاموتو (Miyamoto) و همکاران در سال ۱۹۸۳، آندرسون (Anderson) و همکاران در سال ۱۹۸۹، فاتارپکار (Phatarpekar) و همکاران در سال ۲۰۰۲ و کیسمی (Keysami) و همکاران در سال ۲۰۰۵ و همچنین توسط ساحول حامد (Sahul Hameed) در سال ۱۹۹۳ در کشت لارو *پنئوس ایندیکوس* (*Penaeus indicus*) گزارش شده است (۱۰و ۱۷-۱۴). این نتایج با باکتری های غالباً گرم مثبت جداسازی شده از آب پرورشی مرحله لاروی *پنئوس موندون* متفاوت بودند (۱۸). باکتری های گرم مثبت جداسازی شده در مطالعه جاری *باسیلوس*، *کورینه‌باکتریوم*، *میکروکوکوس* و *استافیلوکوکوس* بودند که *باسیلوس* و *کورینه باکتریوم* در مطالعات قبلی در لارو *ماکروبراچیوم روزنبرگی* (*Macrobrachium rosenbergii*) و در *ماکروبراچیوم روزنبرگی* به عنوان جدایه های غالب گزارش گردیدند (۱۹). باکتری *باسیلوس* در سایر میگوهای خانواده *پنائیده* نیز گزارش شده است (۱). همچنین باکتری گرم منفی *سودوموناس* جداسازی شده در مطالعه حاضر، قبلاً توسط زوکائی فر (Zokaeifar) و همکاران در سال ۲۰۱۲ و راتاناچوای (Rattanachuay) و همکاران در سال ۲۰۰۷ جداسازی و شناسایی گردیده است (۶ و ۱۲). مشابه یافته های کیسمی (Keysami) و همکاران در سال ۲۰۰۵، در پژوهش جاری گونه *ویبریو* به عنوان بالاترین تراکم و شیوع گزارش گردید و به عنوان جنس غالب جداسازی شد (۱۹). این یافته با نتایج به دست آمده در سایر مطالعات نیز مطابقت دارد (۲۳-۲۰). در بررسی حاضر ۱۲ جنس از دستگاه گوارش میگو شناسایی گردید. شاید شناسایی تنها ۱۲ جنس در مطالعه حاضر را بتوان به ۱۰٪ پرگنه‌های بررسی شده در این تحقیق نسبت داد. از این تعداد جنس باکتری در دستگاه گوارش میگو، ۱۱ جنس با باکتری های جداسازی شده از آب استخرهای پرورشی مشترک بودند. آندرسون (Anderson) و همکاران در سال ۱۹۸۹، ۱۵

جنس را از میگوها جداسازی نمودند که از میان آن ها ۱۴ جنس با باکتری هایی که از آب جداسازی شده بودند مشترک بودند (۱۶). در مقابل فاتارپکار(Phatarpekar) ۹ جنس را از لارو *ماکروبراچیوم روزنبرگی* جداسازی نمود که تنها ۵ جنس از آن ها با باکتری های جداسازی شده از آب استخر پرورش میگو مشترک بودند (۱۴). در پژوهش حاضر جمعیت غالب فلور باکتریایی دستگاه گوارش *(ویبریو، سودوموناس* و *باسیلوس)* در آب استخر پرورش میگو نیز جداسازی بودند. این باکتری ها توسط سایر پژوهشگران نیز به عنوان میکروفلوری متداول جداسازی شده اند (۶، ۱۹ و ۲۰). بنابراین می توان گفت که فلور روده آبزیان با فلور باکتریایی محیط زیست آن‌ها به واسطه تغذیه آن ها تحت تاثیر قرار می گیرد. با توجه به این مساله که زیستگاه میگوی بالغ آب و رسوبات استخرمی باشد، می توان نتیجه گیری نمود که جمعیت غالب باکتری های دستگاه گوارش میگو شاید آن هایی باشند که فلور باکتریایی رسوبات و آب تکثیر و پرورش میگو را تشکیل می دهند (۱۰ و ۲۴). به عبارت دیگر انواع مشابه باکتری‌هایی که از دستگاه گوارش میگو و آب پرورشی آن ها جداسازی گردیده و فلور میکروبی میگو را تشکیل می دهند از طریق تغذیه وارد دستگاه گوارش میگو شده اند (۲۵). نتایج بررسی حاضر نشان داد که *باسیلوس*، *میکروکوکوس* و *کورینه‌باکتریوم* مانع رشد بیشتر باکتری های بیماری‌زا شدند. رنگ پیپات (Rengpipat) و همکاران در سال ۲۰۰۰ نیز فعالیت ضدباکتریایی گونه *باسیلوس* را به عنوان پروبیوتیک روی میگوی ببری سیاه نشان دادند (۲۶). گومزگیل (Gomez-GIL) و همکاران در سال ۲۰۰۰ گروه های باکتریایی را به عنوان پروبیوتیک در پرورش لارو آبزیان مورد آزمایش قرار دادند. محققین یاد شده نشان دادند که *باسیلوس* با تغییرات عوامل محیطی سخت پوستان به ویژه با دگرگونی در پاسخ ایمنی شان توانایی ایجاد اثرات ممانعت کننده دارند (۲۷). نتایج مطالعه حاضر در برگیرنده تولید یک ناحیه وسیع عدم رشدی مقابل باکتری های بیماری زای مورد آزمایش بود. بدین صورت که *ویبریوها در درون* سرم فیزیولوژی استریل در مدت ۱۲ ساعت به وسیله افزودن محتویات درون سلولی گونه *باسیلوس* کاملاً کشته شدند. این موضوع به وسیله نتایج تحقیقاتی که *باسیلوس سوبتیلیس* (*Bacillus subtilis*) را به عنوان تولیدکننده ترکیبات ضدباکتریایی و ضدجلبکی گوناگون و وسیعی نشان داده اند نیز تایید می گردد (۲۸). زیمرمن (Zimmerman) و همکاران در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که *باسیلوس* قادر به تولید مواد ضد باکتریایی جدیدی مانند دیفیسیدین و اکسی دیفیدیسین می باشند که در مقابل تعداد وسیعی از باکتری های هوازی و بی هوازی موثر است. محققین یاد شده نشان دادند تاثیر ترکیبات ضدباکتریایی *باسیلوس ها* بهتر از آنتی بیوتیک های متداولی مانند باسیتراسین، باسیلین و باسیلومایسین می باشد (۲۹).

پژوهش دیگری توسط راتاناچوآی (Rattanachuay) و همکاران در سال ۲۰۰۷ برای تاثیر باکتری های جداسازی شده از میگوی وانامی انجام شد که با نتیجه تحقیق جاری مغایرت داشت. این محققین باکتری جداسازی شده را به عنوان *سودوموناس* شناسایی نمودند که فعالیت بیوکنترلی را مقابل *ویبریو هاروئی* (*Vibrio harveyi*) نشان داد (۱۲). بنابراین بسیاری از مطالعات نشان داده اند که ترکیبات تولید شده توسط باکتری ها می‌توانند پاتوژن های باکتریایی را در سیستم آبزی پروری مهار نمایند (۳۰ و ۳۱).

نتیجه گیری

بیشتر باکتری های جداسازی شده از دستگاه گوارش میگو در استخرهای پرورشی نیز یافت شدند. از بین این باکتری ها، *باسیلوس*، *میکروکوکوس* و *کورینه باکتریوم* خاصیت ضدمیکروبی قوی تری داشتند و مانع رشد اکثر باکتری های بیماری زا گردیدند. بنابراین ترکیبات تولید شده توسط این باکتری ها پتانسیل مهار پاتوژن‌های باکتریایی را در سیستم آبزی پروری دارا می باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل محترم مرکز آموزش جهاد

کشاورزی بوشهر به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارنـد.

References

1. Barman P, Banerjee A, Bandyopadhyay P, Mondal KC, Das Mohapatra PK. Isolation, identification and molecular characterization of potential probiotic bacterium, *Bacillus subtilis* PPP 13 from *Penaeus monodon*. Biotechnol Bioinf Bioeng. 2011; 1(4): 473-482.

2. Lightner DV. Red disease of penaeid shrimp. In: Sindermann CJ, Lightner DV (eds.). Disease diagnosis and control in north American marine aquaculture. Developments in aquaculture and Fisheries science 17. Elsevier, Amsterdam. 1988; pp. 100-103.

3. Nash G, Charetana N, Cholada T, Anutra A, Phusit P, Pongcham R. Vibriosis and its control in pond-reared Penaeus monodon in Thailand In: Diseases in Asian aquaculture (Eds: Shariff M, Subasinghe R, Arthur JR). Fish Health section, Asian Fisheries society, Manila. Phillippines. 1992; pp. 143-145.

4. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. Effect of Probiotic on larval growth and development rate of *Macrobrachium rosenbergii* (deMan). Kustem 4th Annual Seminar held at Primula Beach Resort, Kuala Terengganu, Malaysia during May 2-3, 2005. Abstract book, p: 80.

5. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. Effects of putative probiotic bacterium on the survival and growth of juvenile *Macrobrachium rosenbergii* (deMan). The Asian Aquafeeds 2005 Seminar which is scheduled for April 12-13, 2005, in Kuala Lumpur, Malaysia. Abstract book, p: 44.

6. Zokaeifar H, Balcazar JL, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Saad CR. Selection and identification of non-pathogenic bacteria isolated from fermented pickles with antagonistic properties against two shrimp pathogens. J Antibiot. 2012; 65(6): 289-294.

7. Iranian Shrimp Research Center. Available at http://www.isrc.ir

8. MacFaddin JF. Biochemical tests for identification of medical bacteria. 2nd edn. Williams and Wilkins, Baltimore, MD. 1980; p: 527.

9. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. To screen three putative bacteria in juvenile *Macrobrachium rosenbergii* as probiotic based on in-vitro growth characteristics. MSA Golden Jubilee International Science Congress (ISC). August 3-6, 2005 Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia. Abstract book, pp: 144-145.

10. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. A preliminary study to isolation and identification of the aerobic putative bacterial flora in juvenile giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Kustem 4th Annual Seminar held at Primula Beach Resort, Kuala Terengganu, Malaysia during May 2-3, 2005. Abstract book: 78.

11. Chythanya R, Karunasagar I. Inhibition of shrimp pathogenic Vibrios by marine Pseudomonas 1-2 strain. Aquacult. 2002; 208(1-2): 1-10.

12. Rattanachuay P, Kantachote D, Suntinanalert P. Selection of proteolytic bacteria with ability

to inhibit *Vibrio harveyi* during white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) cultivation. Technol. 2007; 29(2): 235-243

13. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. Screening putative bacteria of *Macrobrachium rosenbergii* juvenile as potential applications for control of pathogenic bacteria. Kustem 4th Annual Seminar held at Primula Beach Resort, Kuala Terengganu, Malaysia during May 2-3, 2005. Abstract book: 122.

14. Phatarpekar PV, KenkreVD, Sreepada RA, Desai UM, Achuthakutty CT. Bacterial flora associated with larval rearing of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Aquacult. 2002; 203(3-4): 279-291.

15. Miyamoto G, Brock J, Nakamura R, Nakagawa L, Shimojo R, Sato V, Akita G. A preliminary microbiological and water quality survey of two Hawaiian prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) hatcheries. In: Rogers GL, Day R, Lim A (Editors), Proc. First Int. Conf. Warm Water Aquaculture-Crustacea. Brigham Young University Hawaii Campus, Laie, HI. 1983; pp. 429-458.

16. Anderson IG, Shamsudin MN, Nash G. A preliminary study on the aerobic heterotrophic bacterial flora in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, hatcheries in Malaysia. Aquacult. 1989; 81(3-4): 213-223.

17. Sahul Hameed AS. A study of the aerobic heterotrophic bacterial flora of hatchery-reared eggs, larvae and post-larvae of *Penaeus indicus*. Aquacult 117(3-4): 1993; 195-204.

18. Llobrera AT, Gacutan RQ. Bacteria from sea water used in *Penaeus monodon* larval cultures. Quarterly Research Report, Aquaculture Department, SEAFDEC. 1977; 1(2): 38-40.

19. Keysami MA, Saad CR, Daud HM, Sijam K, Alimon AR. Isolation and identification of putative bacterial flora in juvenile *Macrobrachium rosenbergii*. MSA Golden Jubilee International Science Congress (ISC), Putra World Trade Centre, Kuala Lumpur, Malaysia, August 3-6, 2005. Abstract book: 92.

20. Janarthanam K, George MR, John KR, Jeyaseelan MJP. In vivo and in vitro biocontrol of *vibrio* using indigenous bacterium *Bacillus* spp. Indian J Geomarine Sci. 2012; 41(1): 83-89.

21. Liu CH, Cheng W, Hsu JP, Chen JC. *Vibrio alginolyticus* infection in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* confirmed by polymerase chain reaction and 16s rDNA sequencing. Dis Aquat Organ. 2004; 61: 169-174.

22. Sung HH, Hsu SF, Chen CK, Ting YY, Chao WL. Relationships between disease outbreak in cultured tiger shrimp and composition of *vibrio* communities in pond water and shrimp hepatopancreas during cultivation. Aquacult. 2001; 192(2): 101-110.

23. Song YL, Cheng W, Wang CH. Isolation and characterization of *Vibrio* damsela infection form cultured shrimp in Taiwan. J Invertebr Pathol. 1993; 61: 24-31.

24. Venkat HK, Sahu NP, Jain KK. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora,growth and survival of postlarva of *Macrobrachium rosenbergii(de Man)*. Aquacult Res. 2004; 35(5): 501-507.

25. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. Gut. 1998; 42(1): 2-7.

26. Rengpipat S, Rukpratanporn S. Piyatiratitivorakul S, Menasaveta P. Immunity enhancement in black tiger shrimp (*penaeus mondon*)by a probiont bacterium (*Bacillus* S11). Aquacult. 2000; 191: 271-288.

27. Gomez-Gil B, Roque A, Turnbull JF. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organism. Aquacult. 2000; 191(1): 259-270.

28. Zokaeifar H, Balcazar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N. Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish Shellfish Immunol. 2012; 33(4): 683-689.

29. Zimmerman SB, Schwartz CD, Monaghan RL, Pelak BA, Weissberger B, Gilfillan EC, Mochales S, Hernandez S, Currie SA, Tejera E. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. I. Production, taxonomy and antibacterial activity. J Antibiot. 1987; 40(12): 1677-1681.

30. Alvandi SV, Vajayan KK, Santiago TC, Poornima M, Jithendran KP, Ali SA, Rajan JJ. Evaluation of *Pseudomonas* sp. PM 11 and *Vibrio fluvialis* PM 17 on immune indices of tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Fish Shellfish Immunol. 2004; 17(2): 115-120.

31. Vijayan KK, Bright Singh IS, Jayaprakash NS, Alvandi SV, Pai SS, Preetha R, Rajan JJS, Santiago TC. A brackishwater isolate of *Pseudomonas* PS-102, a potential antagonistic bacterium against pathogenic vibrios in penaeid and non-penaeid rearing systems. Aquacult. 2006; 251(2-4): 192-200.

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 3 & 4, January 2013

Original Article

Isolation and identification of microflora of farm ponds and gastrointestinal tract of western white shrimp *(Litopenaeus vannamei)* beside their evaluation as probiotic

Mina Ziarati[1], Mehran Avakh Keysami[2], Farshid Kafilzadeh[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Aquaculture Biotechnology, Bushehr Agricultural Training Center, Bushehr, Iran
[3]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Abstract

Background and Objectives: Nowadays, Shrimp culture has been prevailed in most of tropical countries; however, a variety of diseases have currently affected the business worldwide. Infectious bacterial agents are the most significant hygienic problems observed in the cultured shrimps . This study was aimed to isolate and identify microflora of farm ponds and western white shrimp gastrointestinal tract (*Litopenaeus vannamei*) in the Bushehr Province farm ponds and their survey as probiotic.

Materials and Methods: The shrimp and pond water samples were collected from 10 farm ponds (located at Bushehr Province). After transferring the samples to laboratory, the shrimp samples were autopsied to access to their intestinal microflora. The isolated bacteria were identified based on biochemical tests, morphology and Biolog software. Antibacterial activities of the isolates against 6 common pathogenic bacteria in shrimps were then investigated using well diffusion and disk diffusion methods.

Results: Overall, 12 bacterial genera were isolated from the farm ponds and shrimp gastrointestinal tract. The majority of bacterial species most abundantly isolated were *Bacillus*, *Vibrio* and *Pseudomonas*. Among the isolated bacteria, *Bacillus*, *Micrococcus* and *Corynebacterium* showed the most antibacterial activity against evaluated pathogenic bacteria.

Conclusion: Almost all the isolated bacteria from shrimp gastrointestinal tract were found in farm ponds as well. The bacterium *Bacillus* sp., for instance, is able to inhibit the growth of pathogens through secreting antimicrobial products.

Keywords: Gastrointestinal tract, *Litopenaeus vannamei,* Pathogenic bacteria.

Correspondance to: Farshid Kafilzadeh
Tel: +989171140799
E-mail: Kafilzadeh@jia.ac.ir
Journal of Microbial World 2013, 5(3&4): 122-131.